

a medicinal cultivar of *Paeonia lactiflora* after different post-harvest processing. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (2014.9.13, Fukuoka, Japan).

- 6) Zhu, S., Yu, X. L., Komatsu, K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived

from *Paeonia lactiflora*. The 28th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 8th International Conference on Biodiversity (ISCNP28 & ICOB8) (2014.10.19-24, Shanghai, China).

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

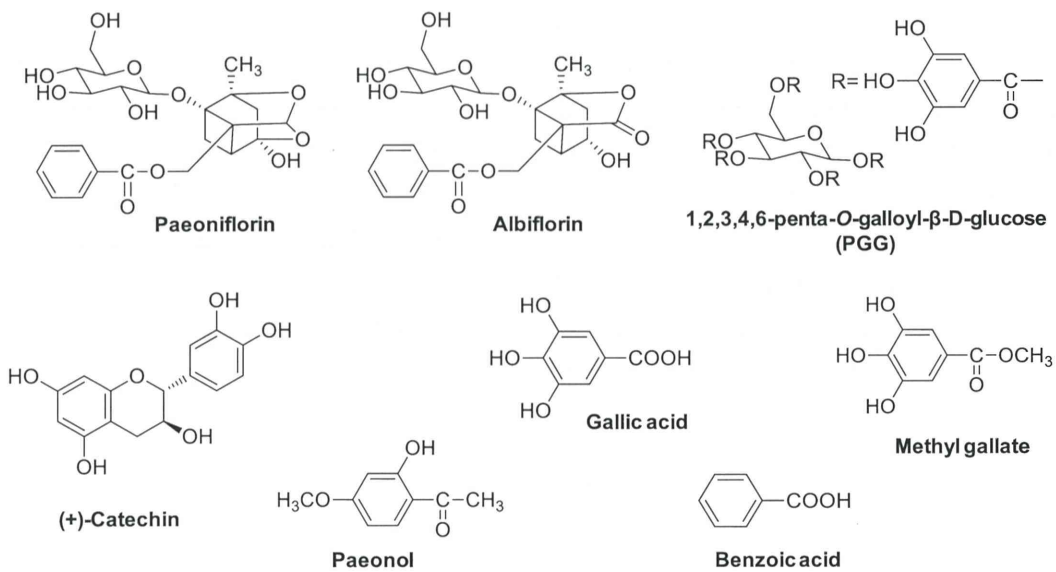
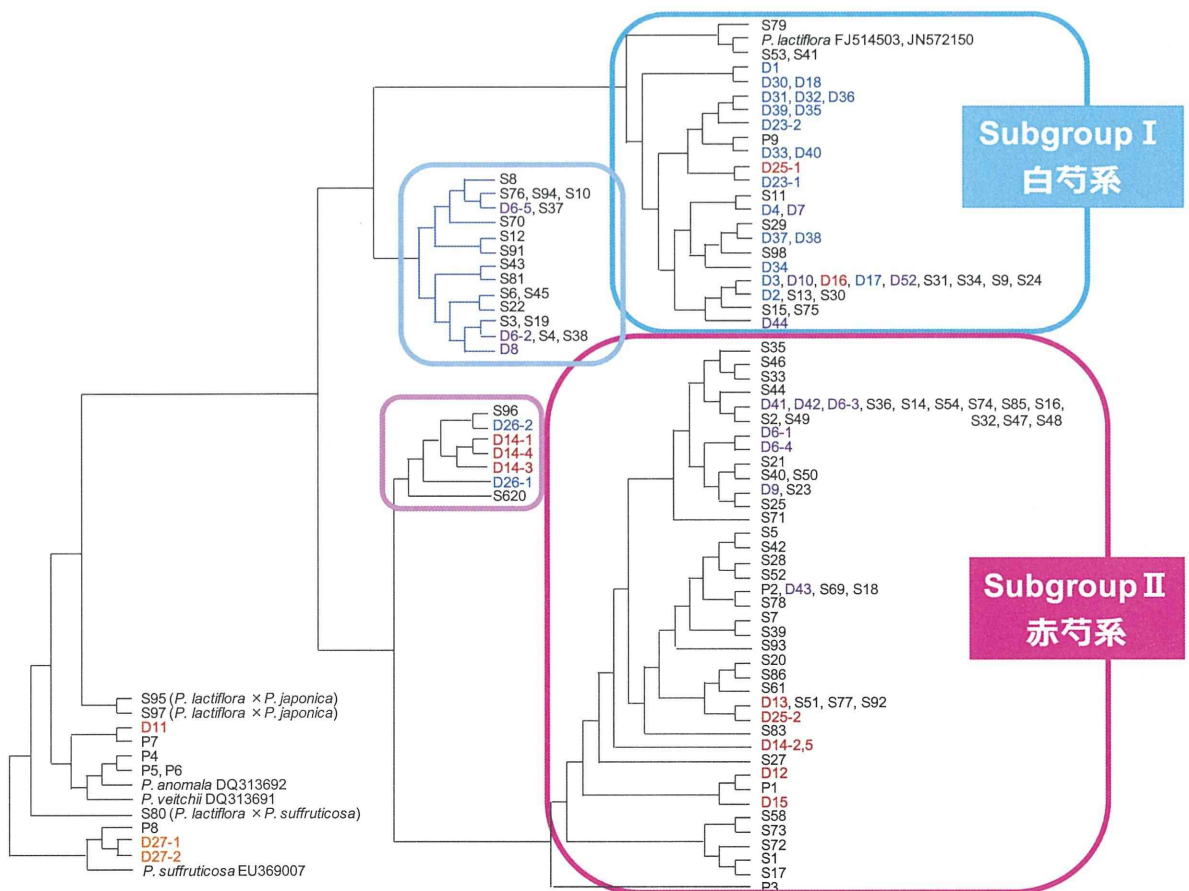


図 1 定量分析に用いた成分の構造式



P: 植物材料 S: 栽培品種 D: 生薬材料

図 2 ITS 領域の塩基配列における類似度  
(多重配列アライメントにおける案内木“系統樹”)

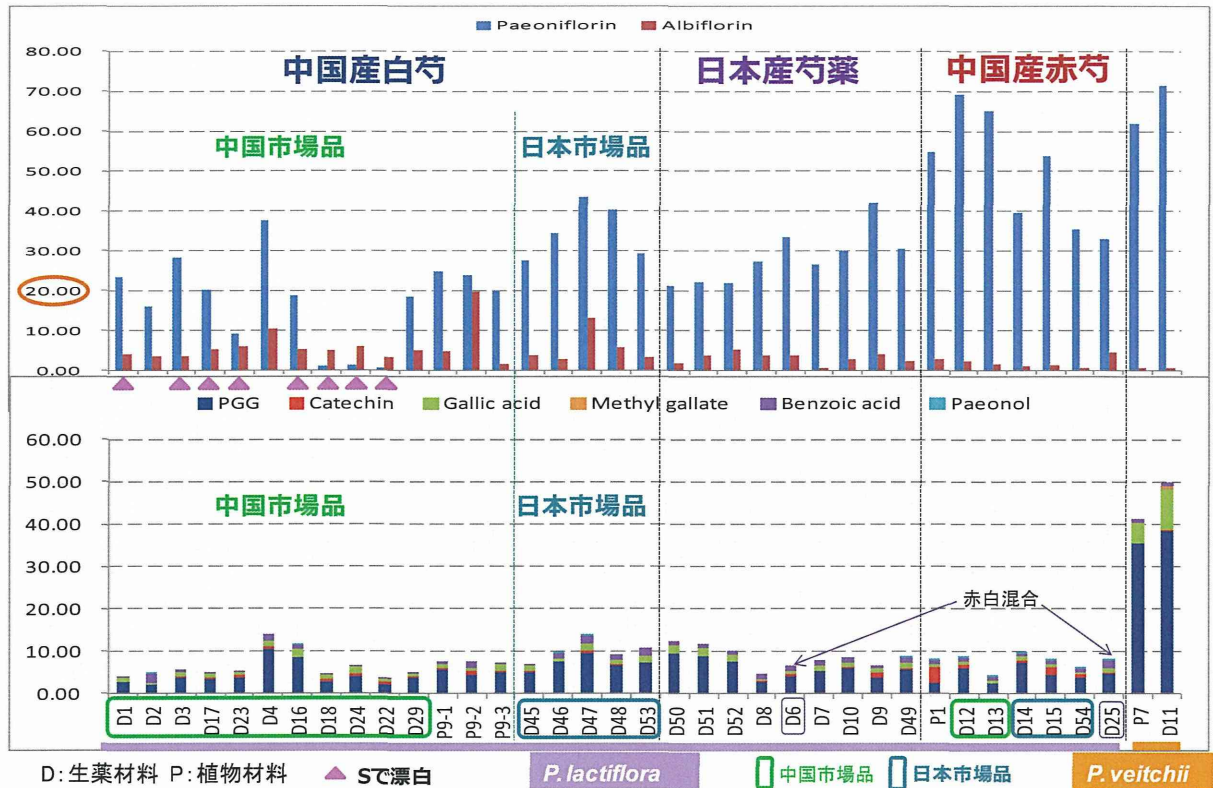


図3 芍薬市場品と *Paeonia* 属植物の根の成分含量

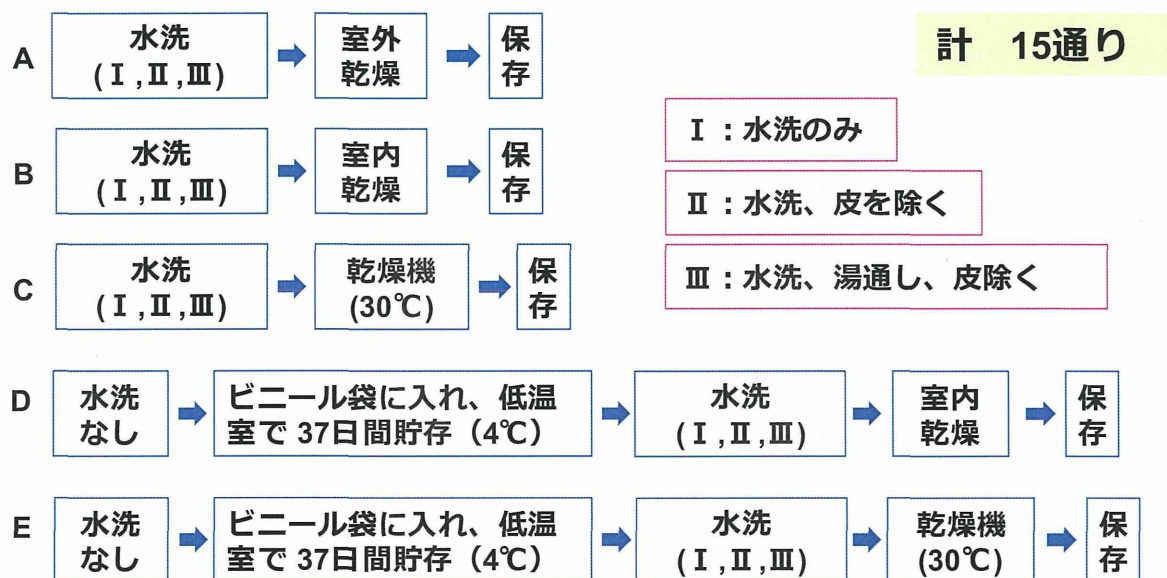
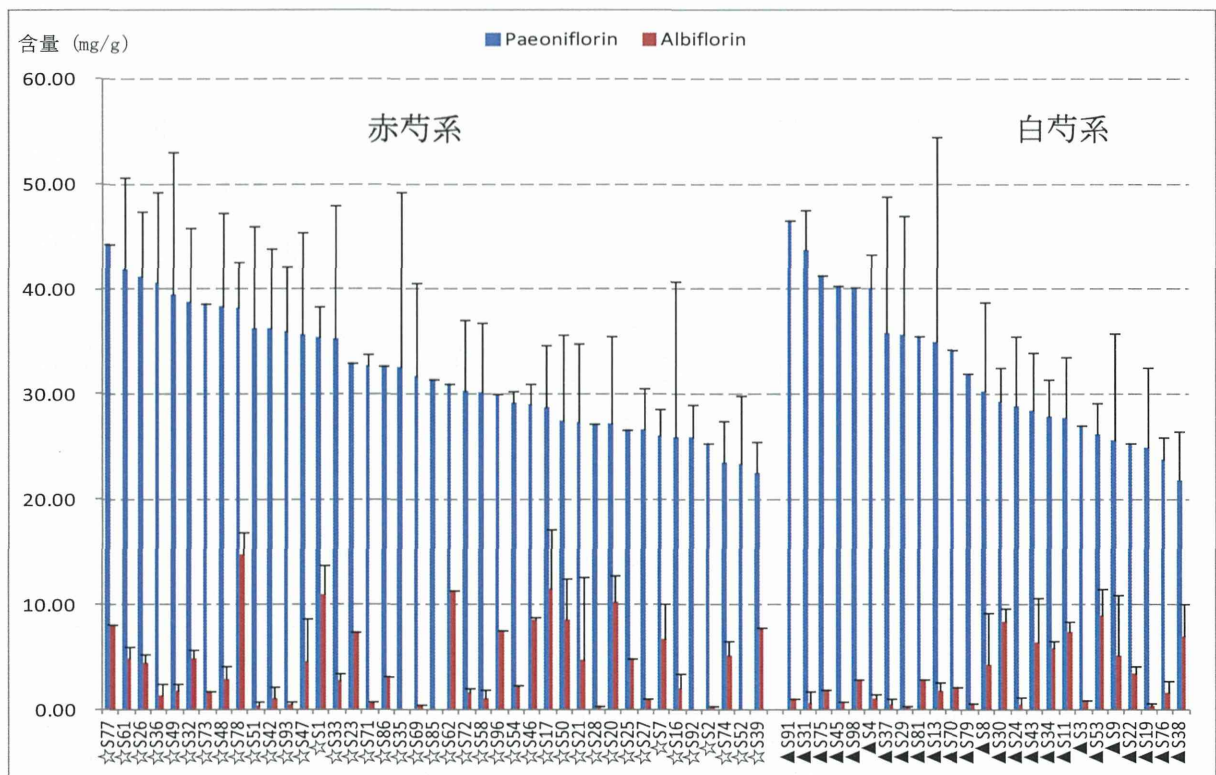


図4 収穫した新鮮な根について行った加工・乾燥法



(平均値±標準偏差)

図 5-1 富山県薬用植物指導センターから入手した栽培品種のうち、Paeoniflorin 含量が 2.0%以上の品種の 2 成分の含量

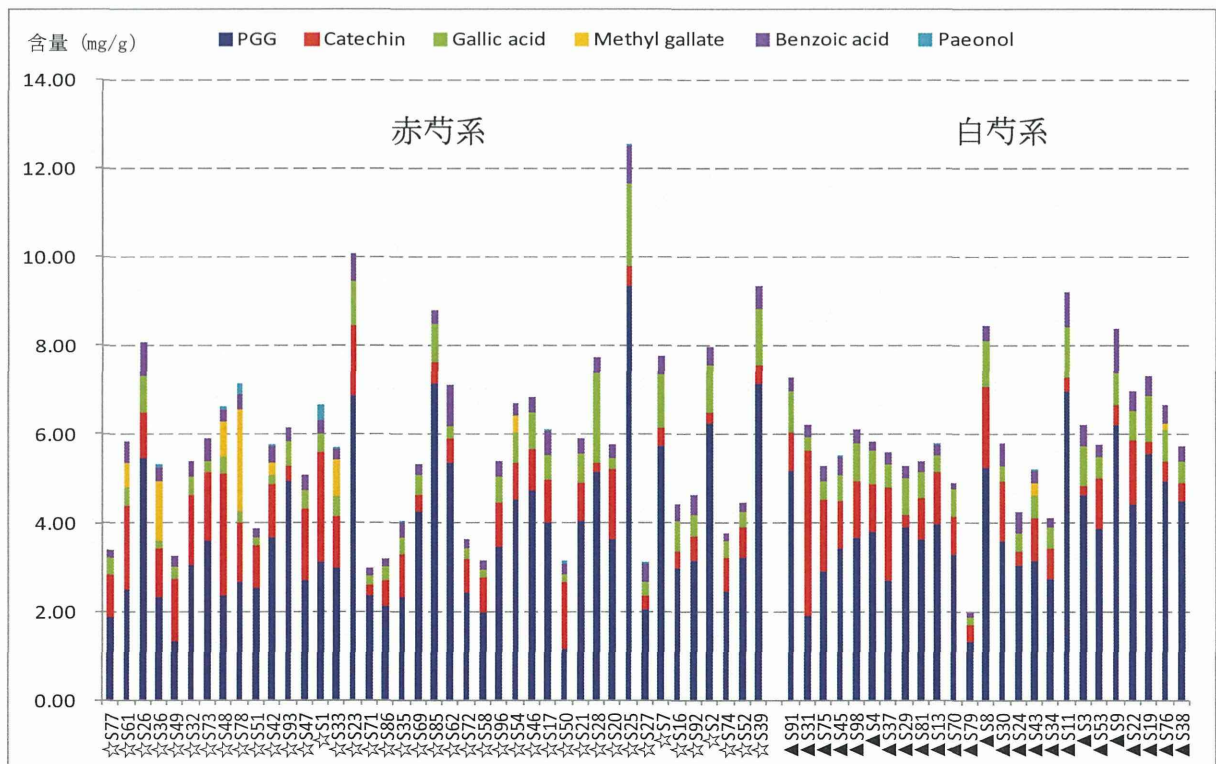


図 5-2 富山県薬用植物指導センターから入手した栽培品種のうち、Paeoniflorin 含量が 2.0%以上の品種の 6 成分の含量

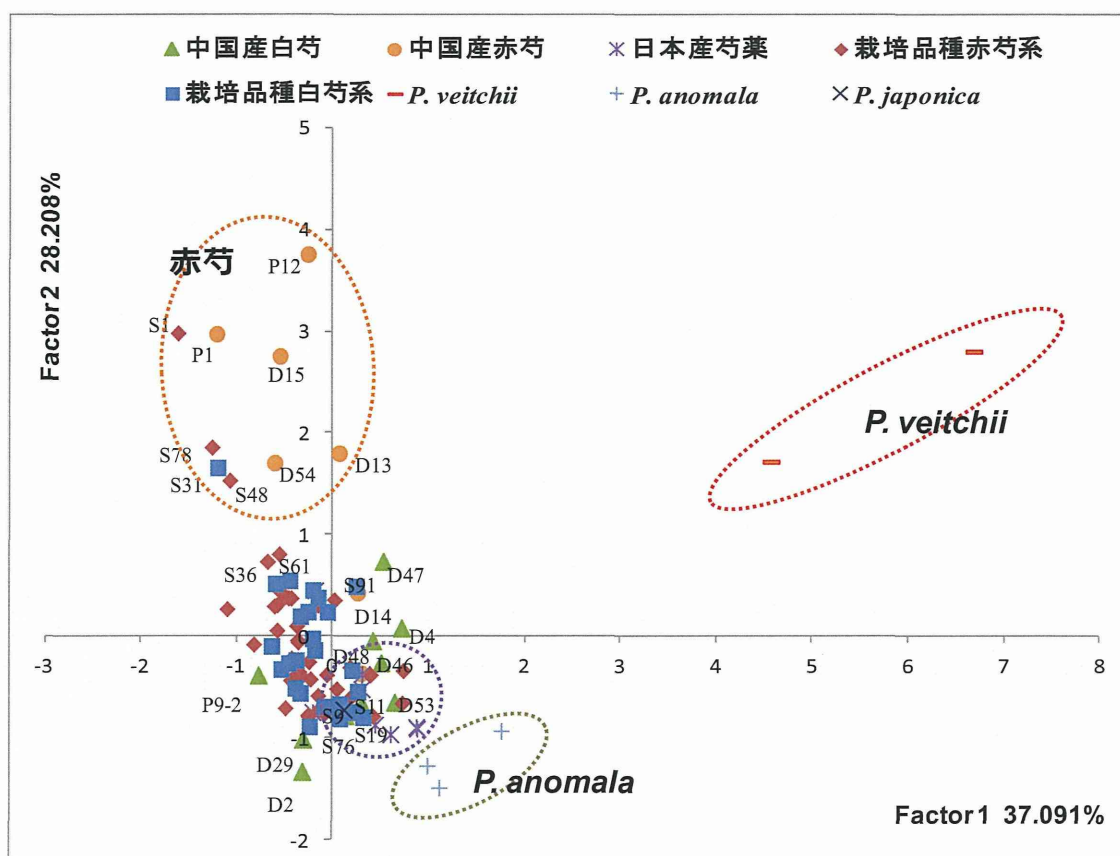
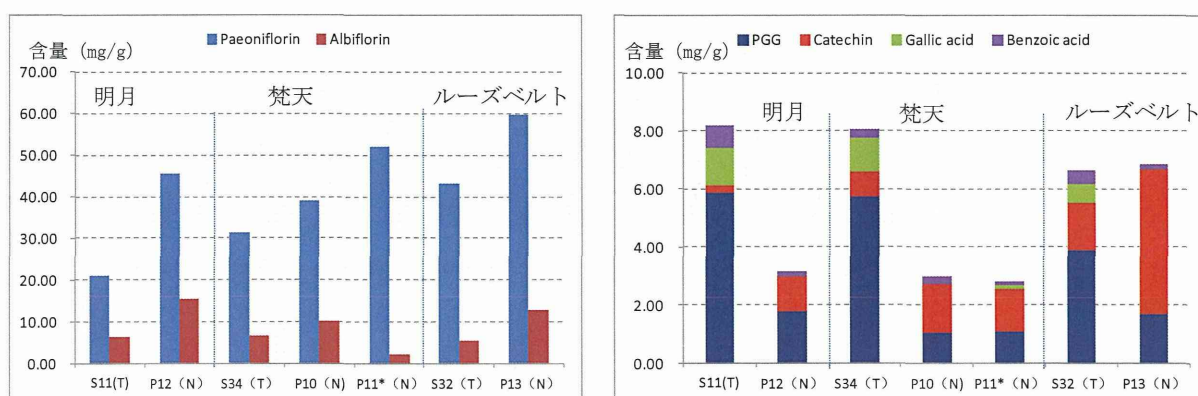


図 6 Paoniflorin、Albiflorin、PGG、Catechin、Gallic acid、Paeonol の 6 成分の定量値を用いた主成分分析



T: 富山県薬用植物指導センターの栽培品 (4年生)  
 N: 富山県薬用植物指導センターの種苗 (根) を長野県菅平試験地で栽培したもの (4年生)  
 \*: 長野県菅平試験地での栽培品 (4年生)

図 7 栽培地 (環境) の違いによる成分含量の変化

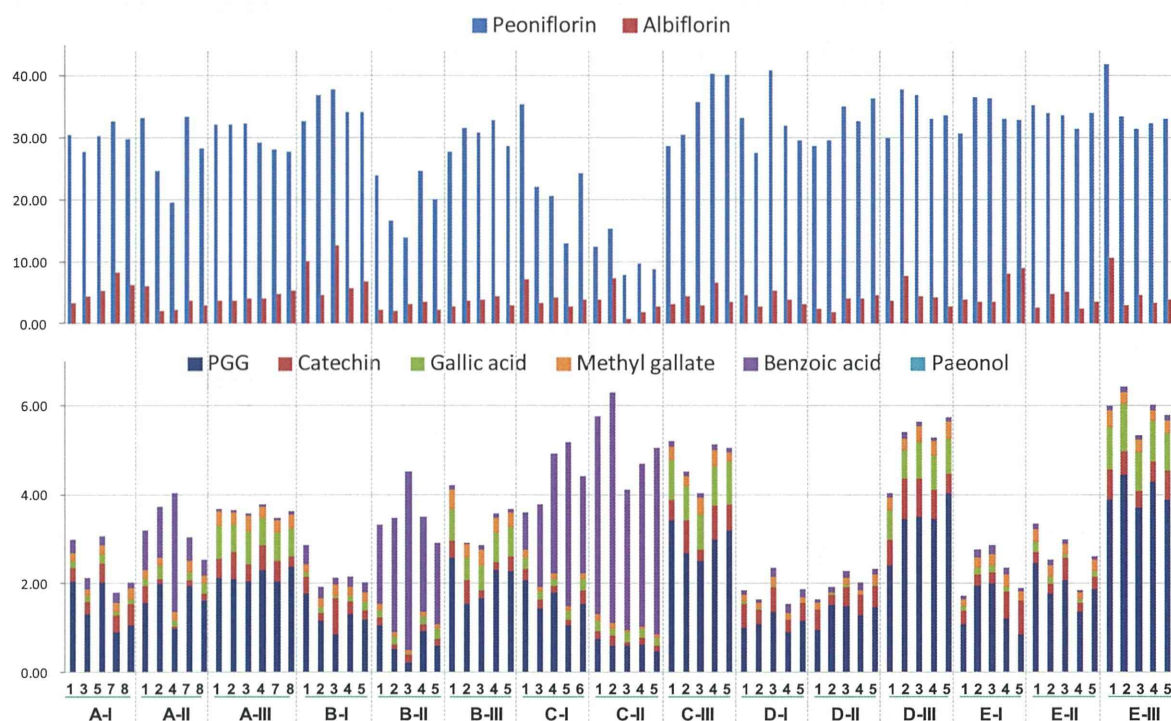


図8 15通りの加工・乾燥法で処理した根（個体ごと）の成分含量  
 I：水洗のみ、II：水洗後、周皮を竹べらで除く、III：水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く  
 A：室外で自然乾燥、B：室内で自然乾燥、C：乾燥機による乾燥、D：低温貯蔵後、室内で自然乾燥、  
 E：低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

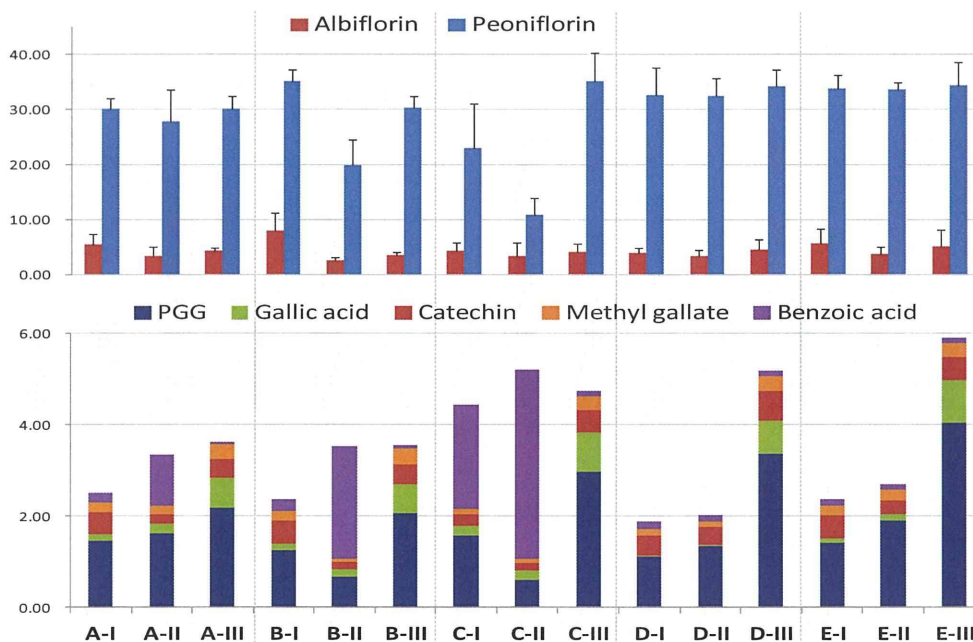


図9 15通りの加工・乾燥法で処理した根の成分含量（平均値）  
 I：水洗のみ、II：水洗後、周皮を竹べらで除く、III：水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く  
 A：室外で自然乾燥、B：室内で自然乾燥、C：乾燥機による乾燥、D：低温貯蔵後、室内で自然乾燥、  
 E：低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

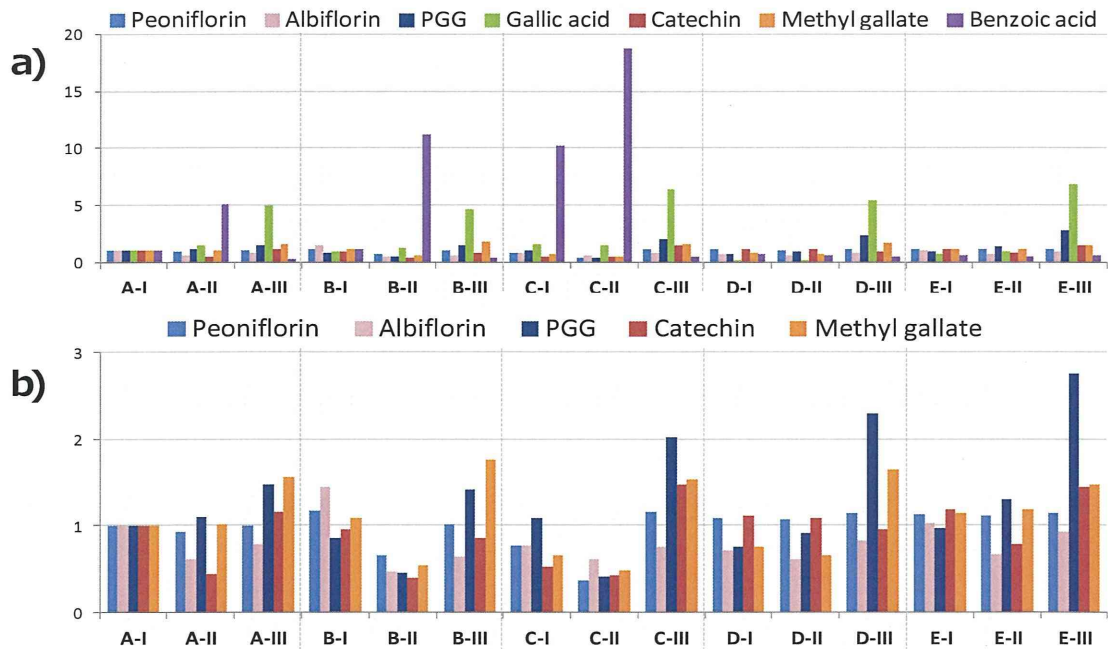


図 10 異なる加工・乾燥法による根の成分含量の変化

a) 7 成分の比較 ; b) Bezoic acid, gallic acid 以外の 5 成分の比較

A-I の調製法を行った時の成分含量を 1 とし、他の調製法で行った時の成分含量を換算した。

I : 水洗のみ、II : 水洗後、周皮を竹べらで除く、III : 水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く

A : 室外で自然乾燥、B : 室内で自然乾燥、C : 乾燥機による乾燥、D : 低温貯蔵後、室内で自然乾燥、

E : 低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

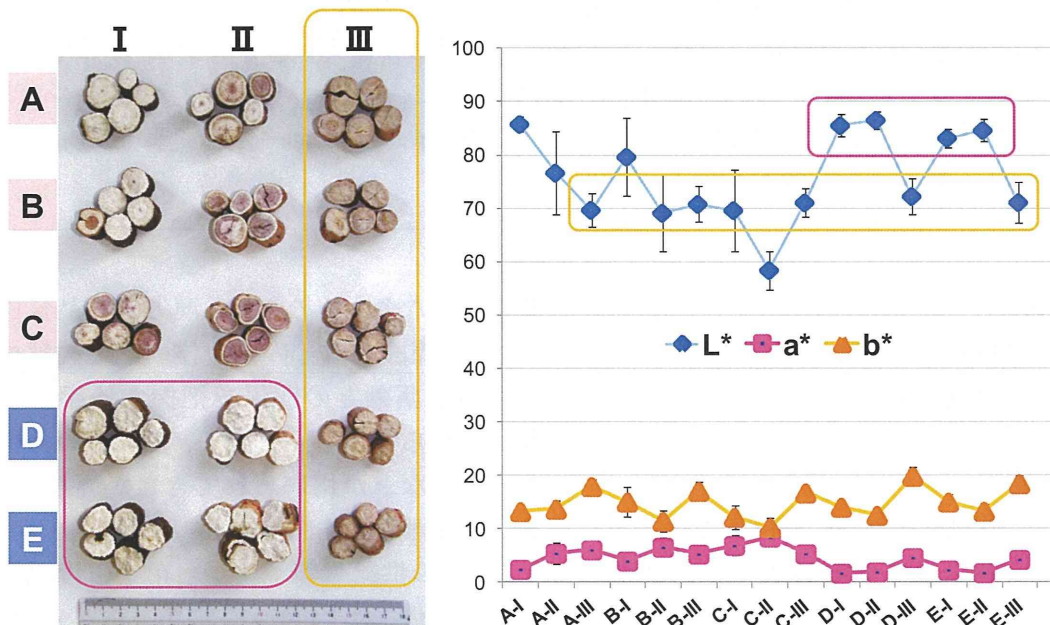


図 11 15 通りの加工・乾燥法で処理した根の横断面色の比較

I : 水洗のみ、II : 水洗後、周皮を竹べらで除く、III : 水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く

A : 室外で自然乾燥、B : 室内で自然乾燥、C : 乾燥機による乾燥、D : 低温貯蔵後、室内で自然乾燥、

E : 低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度～26年度総合研究報告書

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた  
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）

分担研究報告書

分担研究課題：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—イメージングMSを用いたダイオウ及びシャクヤクの主要成分の局在解析—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 イメージング質量分析（MS）は二次元的に MS を行うことにより、生薬及び薬用植物に含まれる薬効成分の組織内分布を視覚的に明らかにできる。ダイオウの根茎及び根におけるセンノシド類と、シャクヤクの根におけるアルビフロリン、ペオノール、カテキン及びペンタガロイルグルコースの組織内分布を検討した。ダイオウに含まれるセンノシド類は根茎の髓の異常維管束に局在し、特に師管またはその周辺に多く存在することが明らかになった。センノシド類のイメージング MS データを2値化し、強度比を算出、高速液体クロマトグラフィーによる定量結果と比較したところ、維管束部位と髓（異常維管束部位）では両測定法ともに髓の方が約2倍多く存在している結果であった。シャクヤクについては、4化合物に最適な質量シグナルを決定し、品種の「梵天」と「エジュリスパーバ」についてイメージング MS を行った結果、アルビフロリン、ペオノール及びカテキンはシャクヤクの根の皮層周辺に豊富に存在し、ペンタガロイルグルコースは全体に分布するが、特に木部に多いことが明らかになった。

研究協力者

平 修 福井県立大学生物資源学部  
准教授

A. 研究目的

二次元的に質量分析（MS）を行うことにより種々の化合物の分布状態を明らかにできるイメージング質量分析（MS）（図1）を用いて、多成分からなる生薬における各成分の分布を明らかし、生薬の品質を視覚的に評価する。

漢方薬は天然物由来の生薬から構成されるため、生薬の品質が漢方薬の薬効を左右す

ることになる。そのため、漢方薬の品質保証には、広範囲な成分の複合体の網羅的解析と、それらと薬効との関係を把握する手法の開発が求められている。従来、多成分の分析にはLC/MSなどが用いられてきたが、サンプル量、前処理方法や感度の面で問題がある。また、生薬の供給量の不足から市場には低品質のものや偽品も出回っており、生薬の簡便、迅速な品質評価技術の開発が急務である。

今回、多成分からなる試料を感度良く分析できる質量分析を応用した新技術であるイメージングMS法により、生薬の「大黃」と「芍薬」の原料であるダイオウ（*Rheum*



*palmatum* L.) の根茎及び根とシャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) の根における主要成分の組織内分布を明らかにすることを目的とする。大黄では、瀉下効果の主要成分であるジアントロン類のセンノシド類 (Sennosides) について根茎と根での局在を比較した。芍薬には鎮痛・鎮痙、抗炎症、活血作用などが報告されており、その作用成分として、Paeoniflorin、Albiflorin、Paeonol、Catechin などが報告されている。そこで本研究ではこれら 4 化合物の根における組織内分布を解析した。

本手法は、免疫染色と異なり、抗体、蛍光物質を用いることなく標的成分群を可視化することができる。一枚の切片 (数十マイクロン) から複数成分の局在を明らかにできることも他の可視化技術と一線を画す。

## B. 研究方法

### 1. ダイオウ

山梨県富士吉田市昭和大学薬用植物園から平成24年5月17日に入手した新鮮なダイオウ (*R. palmatum*) を材料にした。

ダイオウの根茎及び根を凍結し、クライオミクロトーム (Leica社 CM3050) を用いて厚さ50~90 μmの試料切片を作製した。切片を導電性透明電極であるITO (酸化インジウム・スズ) スライドガラス上に載せ、イオン化支援剤 [ $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) または酸化鉄ナノ微粒子] を切片表面にスプレーした。用いた質量分析装置は、フーリエ変換イオンサイクロトロン (FT-ICR) -マトリックス支援レーザー脱離イオン化型 (MALDI) 質量分析装置である。Sennosides (分子量: 862) の局在解析にはイオン化支援剤にCHCAを用い、ネガティブモードで行った。その他の成分は、分子量が500以下であるので、CHCAなどではイオン化支援剤自体のシグナルが妨害するため、測定困難であることから、低分子測定に適したイオン化支援剤の酸化鉄ナノ微粒子 (S. Taira et al. 80, *Anal. Chem.* 2008) を用いてポジティブモードで、各ポイントに1,000ショットパルスレーザーを照射しイオン化した。画

像解像度となるレーザー照射間隔は200 μm または25 μmでイメージング質量分析測定を行った。

Sennosidesの定量では、イメージングMSデータを画像解析ソフト (Image J) により2値化した後、単位面積当たりの強度を算出した。一方、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりSennoside A及びSennoside Bを定量した。定量では、根茎を維管束部位と髄 (異常維管束を含む) に分けて行った。

HPLCによる定量方法は次のとおり：  
標準品 Sennoside A 及び Sennoside B (Wako Pure Chem. Inc.)

測定条件 装置: Shimadzu HPLC システム (Pump: LC-20AD, Gradient unit: CBM-20A, Auto sampler: SIL-20AC, Detector: SPD-M20A Diode array detector, Column oven: CTO-20AC); カラム: Cosmodil ODS-AQ, 250×4.6 mm, i. d., s-5 μm; 移動相: A: アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸水溶液、B: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液。  
HPLC条件: 0-50 min, 8-27% A、50-62 min, 27-33% A、62-70 min, 33-45% A、70-75 min, 45-84% A、75-90 min, 100% A; for wash、90-120 min, 100-8% A; for initial stabilization。注入量: 20 μL; 流速: 0.8 ml/min; カラム温度: 45°C; 検出波長: 232 nm。データ処理プログラム: LC-Solution。

試料溶液の調製 切断した根茎を粉碎し、得られた粉末300 mgを正確に量り取り、遠心チューブに入れ、100% エタノール10 mlを加えて、15分間超音波抽出を行った。遠心分離した (10 min、4000 rpm) 後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに2回 (10 ml, 10 ml) 繰り返した後、全上澄み液を合せて溶媒を減圧留去して、乾燥エキスとした。乾燥エキスをHPLC用MeOH・H<sub>2</sub>O (8:1) に溶解し、10 mlにメスアップした。そのうち約1 mlをDISMIC-13 HP disposable syringe filter 0.2 μm で濾過してHPLC用バイアルに入れ、分析用の試料とした。これらについて、絶対検量線法で2成分を定量した。

## 2. シャクヤク

シャクヤク (*P. lactiflora*) の園芸品種「エジュリスパーバ」(富山県薬用植物指導センターから平成25年7月30日に入手、栽培6年目)の根を凍結したものから、クライオミクロトームにより厚さ20  $\mu\text{m}$ の試料切片を作製した。切片を導電性透明電極であるITO(酸化インジウム・スズ)スライドガラス上に載せ、イオン化支援剤[2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)]を切片表面にスプレーした。質量分析装置としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化型(MALDI)飛行時間(TOF)質量分析装置を用い、Pentagalloylglucose(PGG)はネガティブモードで、その他のAlbiflorin、Paeoniflorin、Paeonol、Catechinはポジティブモードで、各ポイントに1,000ショットパルスレーザーを照射しイオン化して測定した。画像解像度となるレーザー照射間隔は100  $\mu\text{m}$ 。

## C. 研究結果

### 1. ダイオウの根茎部のイメージングMS

予備実験として、Sennoside A、Sennoside Bの標品の質量分析を行った。 $[\text{M}-\text{H}]^-$  ( $m/z$  861)と、 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  ( $m/z$  430.5)の2つのシグナルが検出された。これは、Sennosidesがその構造にカルボキシル基を2つ持っていることに起因する。このことから、ダイオウ切片においてセンノシドをイメージングする際には、 $m/z$  861 または 430.5 のシグナルに注目すればよいことがわかった。

切片表面からSennosides A、Bに対応する質量( $m/z$  861、430.5)のシグナルが検出された。図2に、 $m/z$  861 でイメージングした根茎の横切片の結果(画像解像度200 mm)を示す。Sennosides A、Bは、木部の他、特に髓の異常維管束周辺に特異的に局在していることがわかった。異常維管束周辺を、画像解像度25 mmで高解像度にイメージングしたところ(図3)、Sennosidesは異常維管束の師管またはその周辺に存在していると思われた。

イメージングMSデータ(n=2)を2値化し

強度比を解析したところ、ダイオウ根茎の維管束部位と髓部(異常維管束部位)におけるSennosidesの強度比は1:2.5であった。HPLC分析の結果は、維管束部位での含量が0.32 mg/g (Sennoside A:0.14 mg/g、Sennoside B:0.18 mg/g)、髓部(異常維管束部位)での含量が0.59 mg/gであった(Sennoside A:0.13 mg/g、Sennoside B:0.46 mg/g)。存在比において、イメージングMSとHPLC分析の結果がほぼ一致した。イメージングMSから視覚的に得られた情報、すなわち、異常維管束にSennosidesが局在していることと、維管束部位との局在比率の正しさが、Sennosidesの定量結果から支持された。

ダイオウの根に関して、Sennosidesの局在を解析したところ、周皮や皮層から師部付近に局在している事が分かった(図4)。

## 2. シャクヤク

Albiflorin、Paeoniflorin (Mw: 480.163:  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ )、Paeonol (Mw: 166.063:  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ )、Catechin (Mw: 290.079:  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ )、PGG (MW: 940.118:  $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{26}$ )を標的として質量分析イメージングを行った。

予備実験として、MALDI-TOF-MSでAlbiflorin、Paeoniflorin、Paeonol、Catechinの標品の質量分析を行った。イオン化支援剤としてDHBを用い、ポジティブモード(PGGはネガティブモード)で分析した。Albiflorinではプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ( $m/z$  481)及びナトリウムイオン付加分子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ( $m/z$  503)が検出され、一方、Paeoniflorinでは $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ( $m/z$  503)のみが検出された(図5)。AlbiflorinとPaeoniflorinは組成式が同じであるため、質量から両者を識別するのは困難であるが、プロトン化分子が検出されたのはAlbiflorinだけであった。この知見より、 $m/z$  503のシグナルはAlbiflorinであるかPaeoniflorinであるかを区別することはできないが、 $m/z$  481のシグナルであればAlbiflorinである可能性が高い。さらに、MALDI-TOF-MSでポストソース分解を行った

ところ、Albiflorinでは $m/z$  197のフラグメントイオンが生じた（図6）が、Paeoniflorinでは検出されなかった。

Paeonolではプロトン化分子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  167) が検出され、また、Catechineでもプロトン化分子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  291) が検出された。一方、PGGではネガティブモードで脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  が検出された。

以上のように、標品のイオン化を確認できたことから、シャクヤクの横断切片においてこれらの質量シグナルに着目することでイメージングが行えることが示唆された。

Albiflorinでは $m/z$  197のフラグメントイオンが生じることが分かっているため、プロトン付加体である $m/z$  481と $m/z$  197のイメージング像を比較した。その結果、シャクヤクの品種「梵天」では周皮下の皮層から師部付近で $m/z$  481と $m/z$  197の局在が一致していたため、これをAlbiflorinの局在と考えた（図7a）。「エジュリスパーバ」では $m/z$  197の局在は「梵天」と同様であったが、 $m/z$  481でイメージングすると、木部にも多少存在が確認できる。今後の実験が必要であるが、木部の $m/z$  481の物質はPaeoniflorinである可能性がある。

Paeonolではプロトン化分子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  167) が検出され、周皮下の皮層に局在していた（図7b）。また、Catechineでもプロトン化分子  $[M+H]^+$  ( $m/z$  291) が検出され、全体に局在が見られるが特に皮層に多く存在していた（図7c）。

PGGの脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  ( $m/z$  939) でイメージングした結果、「梵天」、「エジュリスパーバ」共に、根の全体に存在するが、特に木部に局在を確認した（図7d）。

以上のように、標品のイオン化を確認できた質量シグナルに着目することにより、シャクヤクの根の横断切片において、Albiflorin、Paeonol、Catechin及びPGGのイメージングMSを行うことができた。

## D. 考察

### 1. ダイオウ

Sennosides は根茎の髄の異常維管束に局

在し、特に師部またはその周辺に多く存在していることが示唆された。髄の異常維管束は地上部の茎とは連結しておらず、根茎から直接出ている葉の維管束に連結している。高解像度イメージングMSにより局在部が師部であろうと考えられることから考察すると、この部位に存在する Sennosides は、根茎から出ている葉の芽で産生されていることが仮説の域ではあるが考察される。一方、根においては、Sennosides は周皮や皮層から師部付近に局在していた。

生薬「大黄」では、「錦紋大黄」のように根茎の髄のみから加工された生薬が、青海省や甘粛省で生産されている。一方、四川省では根茎の周皮を取り除き、横断されたものが「馬蹄大黄」と称される。今回の研究で、Sennosides は根茎の髄の中でも、特に異常維管束に局在していることが視覚的に示された。「異常維管束が認められることが、大黄の正品である証しである」とする鑑定上の見解は、暗に Sennosides の存在を指していたとも考えられ、このことが今回のイメージングMSによる研究で証明された。

### 2. シャクヤク

AlbiflorinやCatechinが周皮下の皮層から師部付近に存在していることが明らかになり、シャクヤクの新鮮根を加工調製する際、皮取り加工をすることによりこれら2成分の含量が減少するというHPLC分析の結果とよく一致した。HPLC分析の結果では、Paeonolは「エジュリスパーバ」に検出され、「梵天」には検出されなかった。しかし、今回のMSイメージングでは梵天1では少ないものの、梵天2では明らかに皮層に局在が観察された。Paeonol含量の皮取り加工による減少については現在検討中である。PGGは木部に局在することが分かった。PGGは湯通し加工により含量が増えることが分かっており、今後この現象をMSイメージングで捉えることも可能であろう。このように、イメージングMSはシャクヤクの加工調製法を決める際、有益な知見を与えることが分かった。なお、Paeoniflorinの組織内分布については、同

一質量を分離識別できるイオンモビリティ質量分析を駆使することで達成できると考えている。今後の検討課題である。

#### E. 結論

イメージング質量分析 (MS) は、二次元的に MS を行うことにより種々の化合物の組織内分布を視覚的に明らかにできる。今回、ダイオウの根茎及び根の横切片について、Sennosides の分布を検討した結果、Sennosides は根茎の髄の異常維管束に局在し、特に師部またはその周辺に多く存在することが明らかになった。また、髄 (異常維管束部位) における Sennosides の含量は維管束部位の約 2 倍であることがイメージング MS 像と HPLC 分析の結果から明らかになった。このように、MS イメージングによる視覚データに、定量的な信頼性を付与する事ができた。一方、根では周皮や皮層から師部にかけて Sennosides の局在が見られた。

芍薬の機能性成分である Albiflorin、Catechin 及び Paeonol はシャクヤクの根の

皮層周辺に豊富に存在し、PGG は根全体で特に木部に多いことが明らかになった。なお、質量解析において、同一の組成式をもつ化合物 (Albiflorin と Paeoniflorin) である場合、フラグメントイオンを解析することにより化合物を特定し、そのイメージング像を取ることができることを確認した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) 越村佳奈、平修、朱姝、植松宏平、片野肇、小松かつ子：生薬原料(大黄)の2次代謝物のイメージング質量分析による局在解析. 第 14 回日本食品工学年次大会 (2014. 8. 8-9、つくば).

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

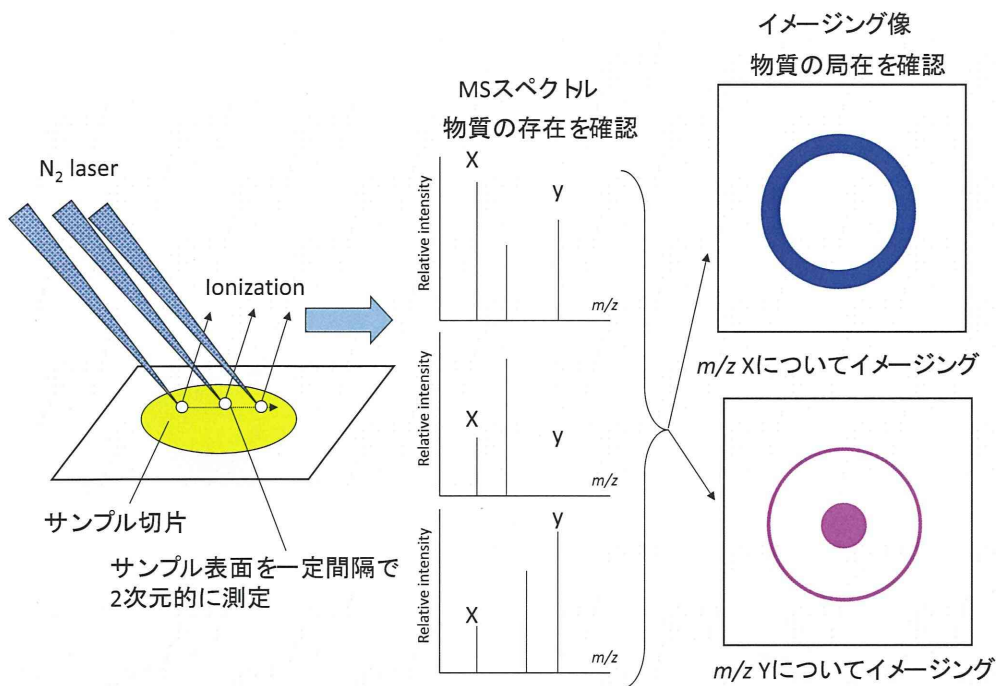


図1 イメージング質量分析の原理

切片上を2次元的にMS測定後、注目したいシグナルに対してイメージすることで注目成分の2次元の局在を示すことができる。

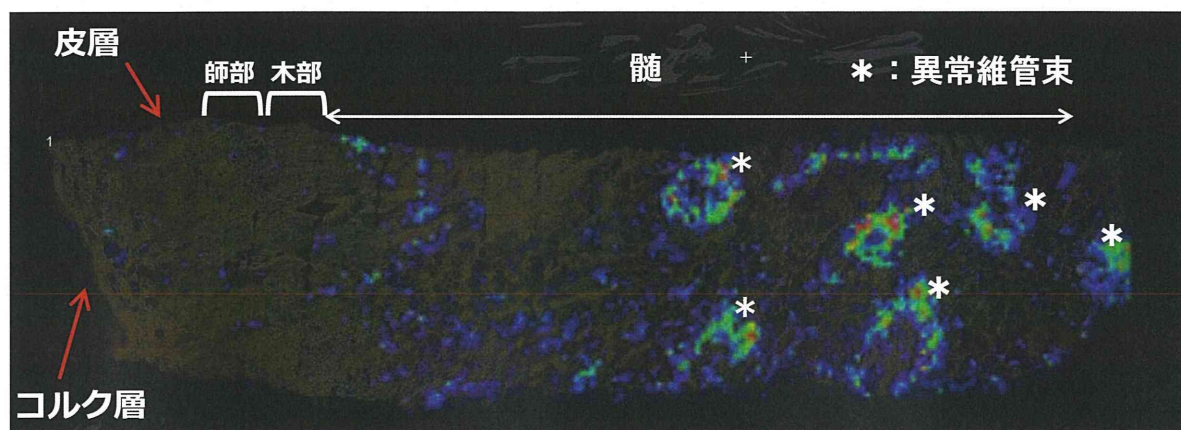


図2 ダイオウの根茎の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—Sennosides A, B  
ダイオウについて、Sennosides A, Bの脱プロトン体  $m/z$  861でイメージングした。イオン化支援剤としてCHCAを使用。

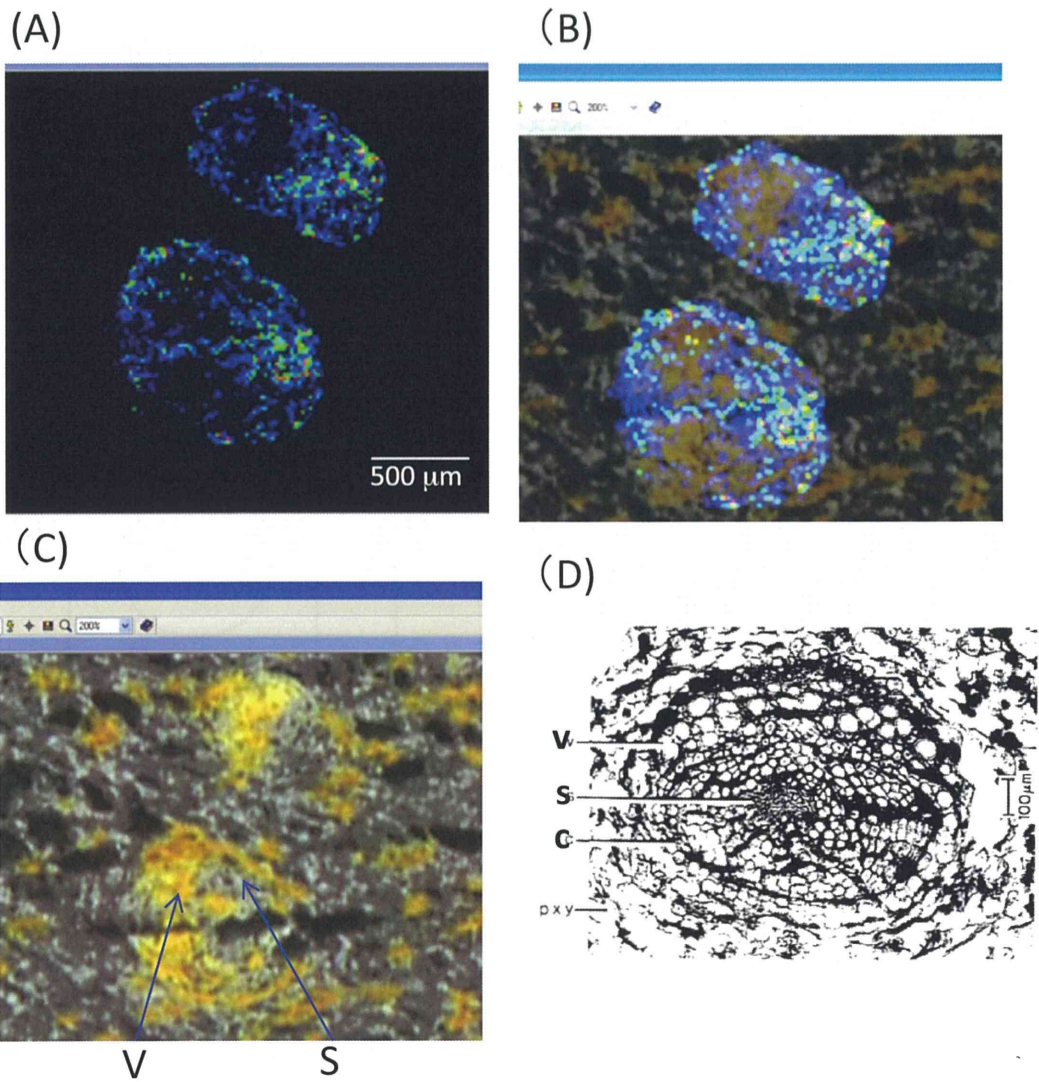


図3 ダイオウ根茎の髓の異常維管束部位の高解像度イメージング質量分析像 (A)と重ね合わせ像 (B)  $[M-2H]^{2-}$   $m/z$  430.5でイメージした。切片光学像 (C)、異常維管束部位の解剖図 (D)。 S: 篩管、C: 形成層、V: 道管

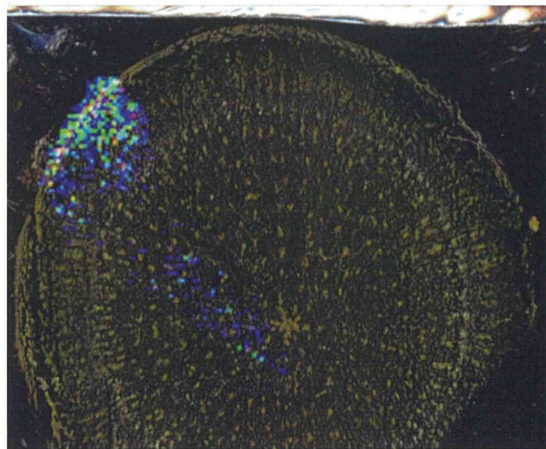


図4 ダイオウの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—Sennosides A, B  
ダイオウについて、Sennosides A, Bの脱プロトン体  $m/z$  861でイメージングした。

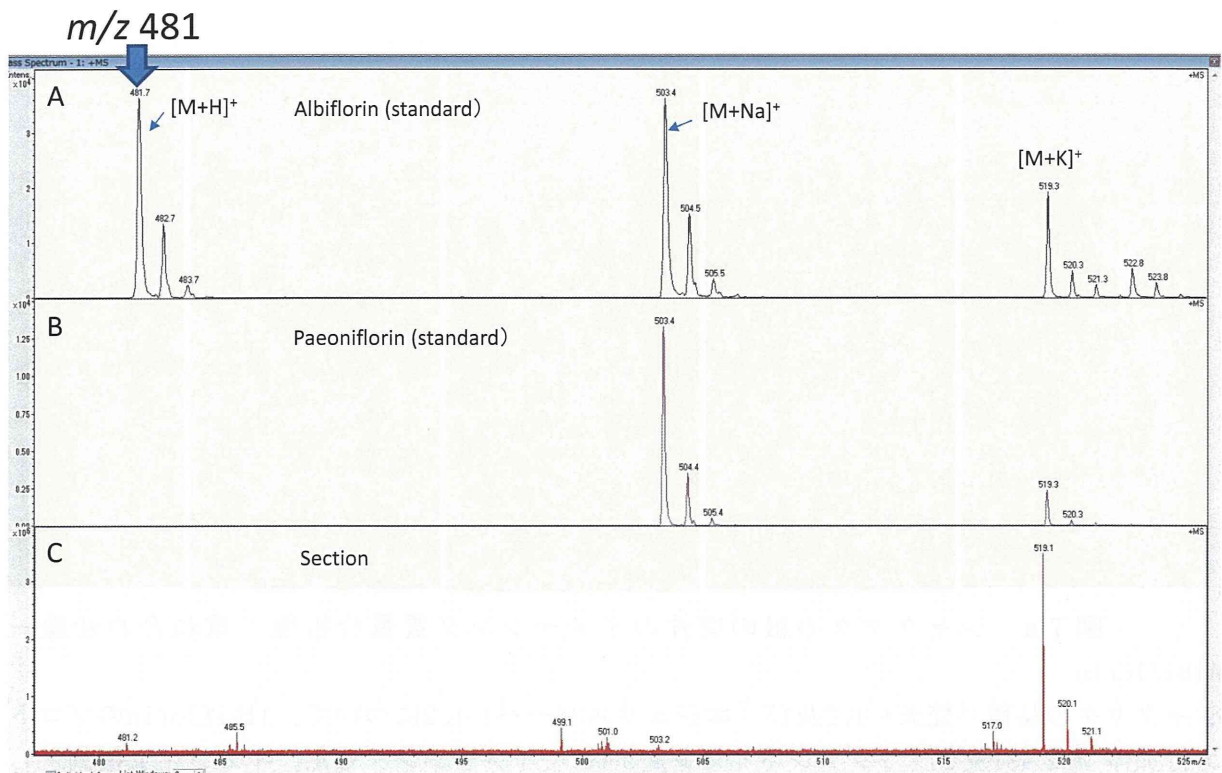


図5 MALDI-TOF-MSによる質量分析

A: Albiflorin (MW: 480.1632 :  $C_{23}H_{28}O_{11}$ ), B: Paeoniflorin (MW: 480.1632 :  $C_{23}H_{28}O_{11}$ ), C: シヤクヤクの横断切片。イオン化支援剤としてDHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) を用い、ポジティブモードで測定した。

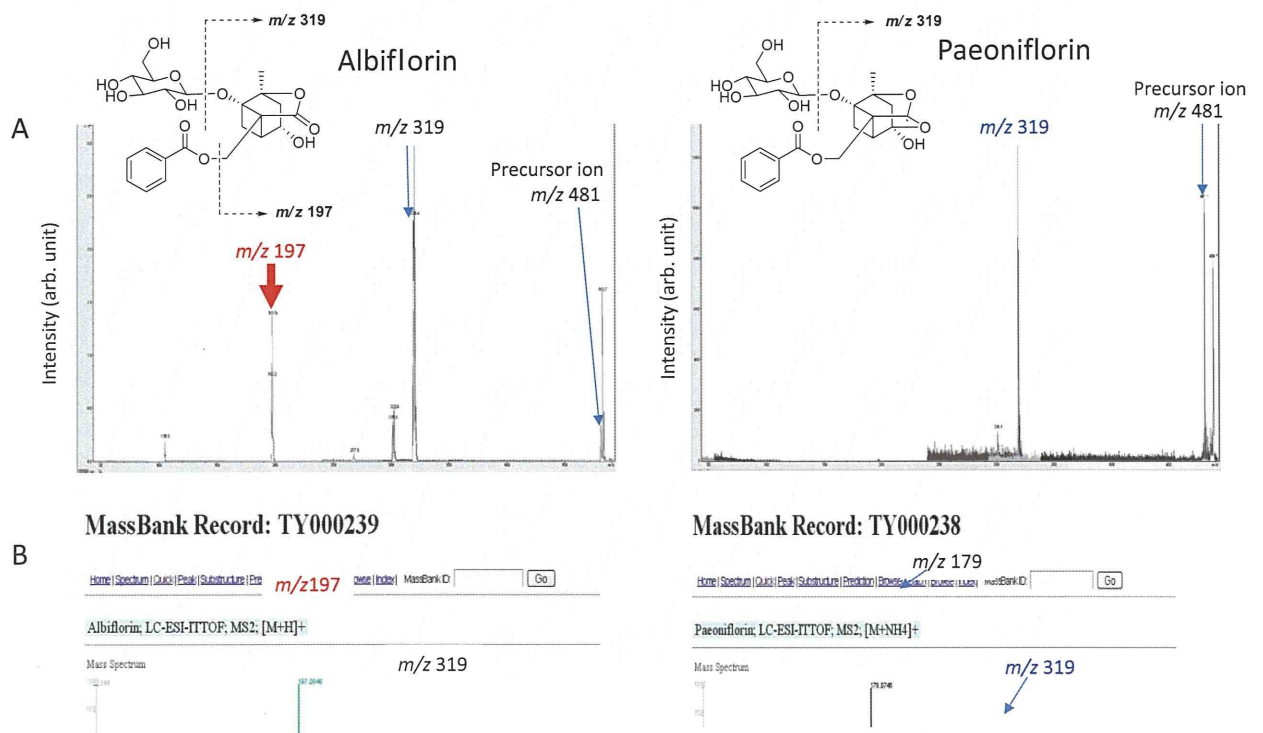


図6 AlbiflorinとPaeoniflorinのMSスペクトル

A:  $m/z$  481に対するPSD (post source decay) MSスペクトル、  
B: データベースによるダンデンMS ( $MS^2$ ) スペクトル

Albiflorin (Me: 480.1632) [M+H]<sup>+</sup>

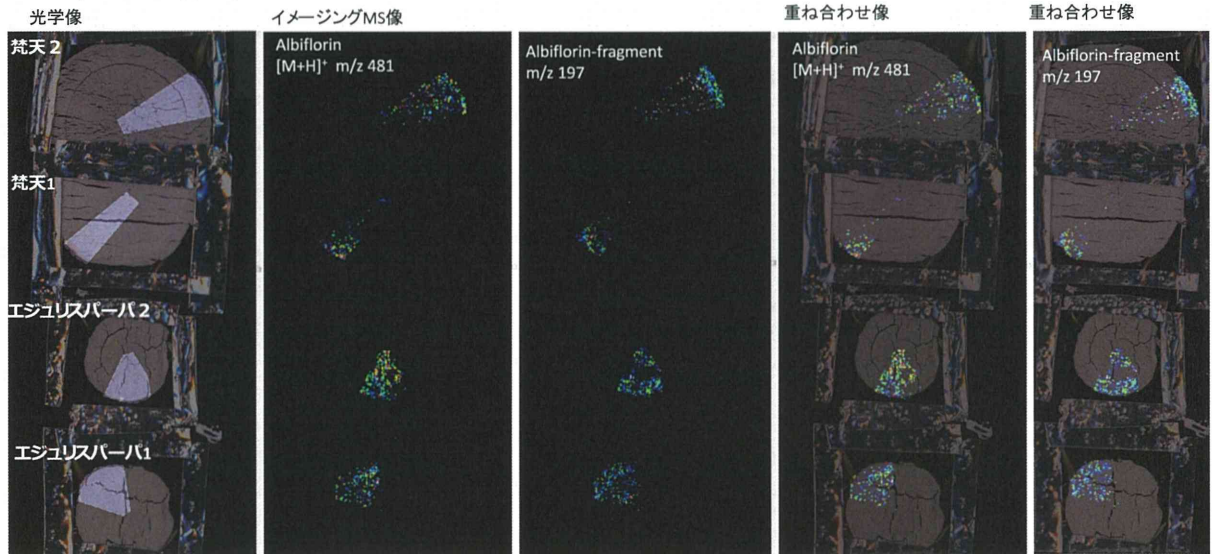


図7a シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—Albiflorin

シャクヤクの品種「梵天」1,2及び「エジュリスパーバ」1,2について、Albiflorinのプロトン付加体  $m/z$  481及びフラグメントイオン  $m/z$  197でイメージングした。イオン化支援剤としてDHBを使用。

Paeonol (Me: 166.0630) [M+H]<sup>+</sup>

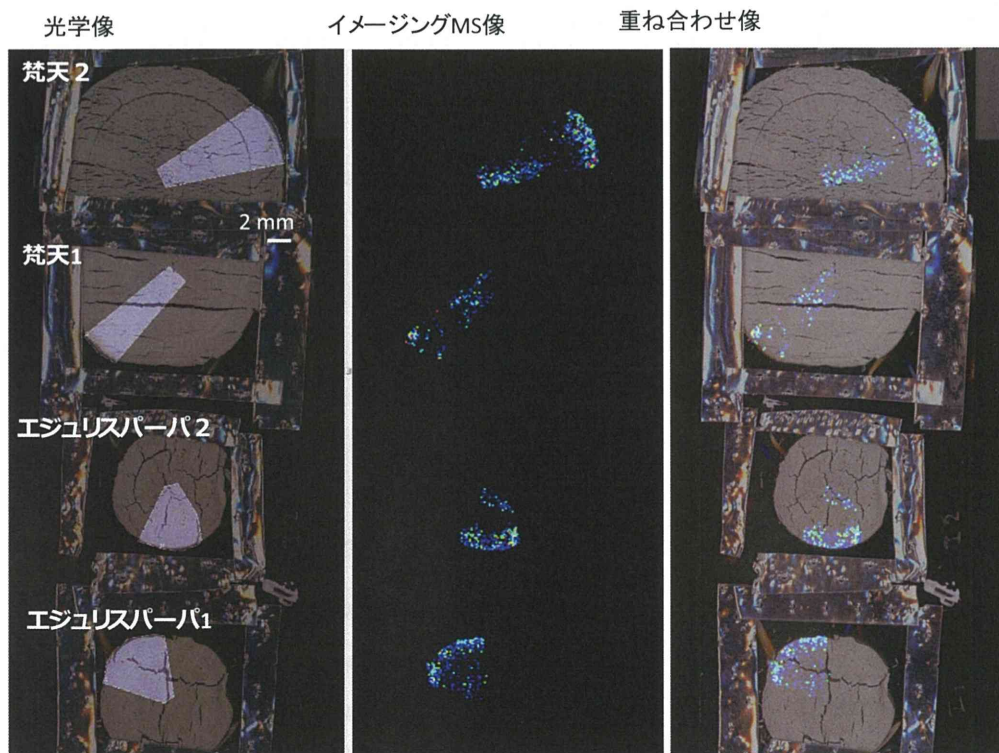


図7b シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—Paeonol

シャクヤクの品種「梵天」1,2及び「エジュリスパーバ」1,2について、Paeonolのプロトン付加体  $m/z$  167でイメージングした。



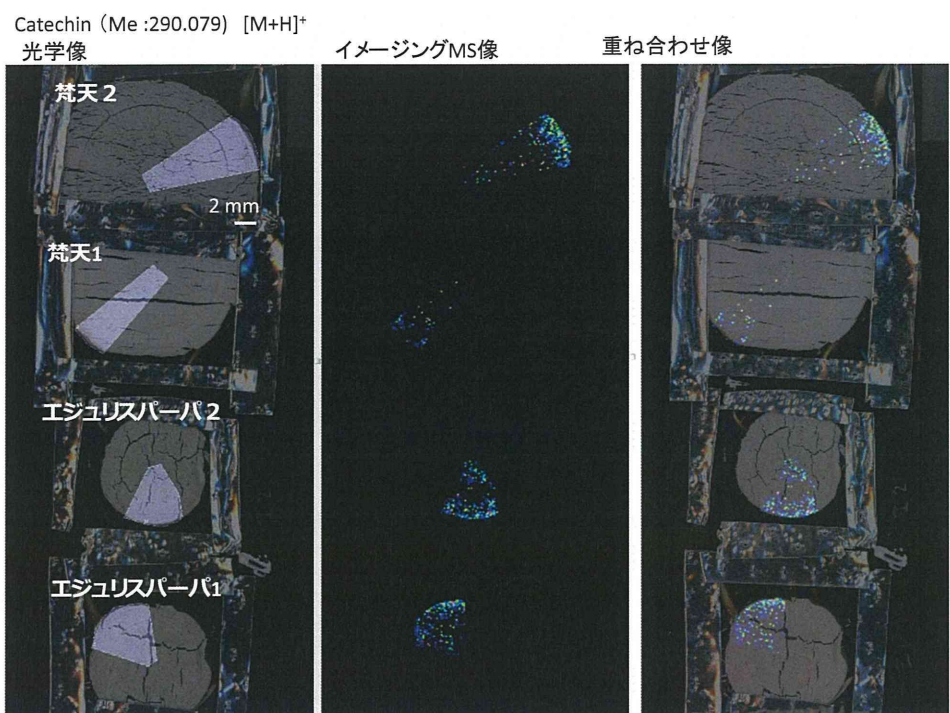


図7c シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像-Catechin  
 シャクヤクの品種「梵天」1,2及び「エジュリスパーバ」1,2について、Catechinのプロトン  
 付加体  $m/z$  291でイメージングした。

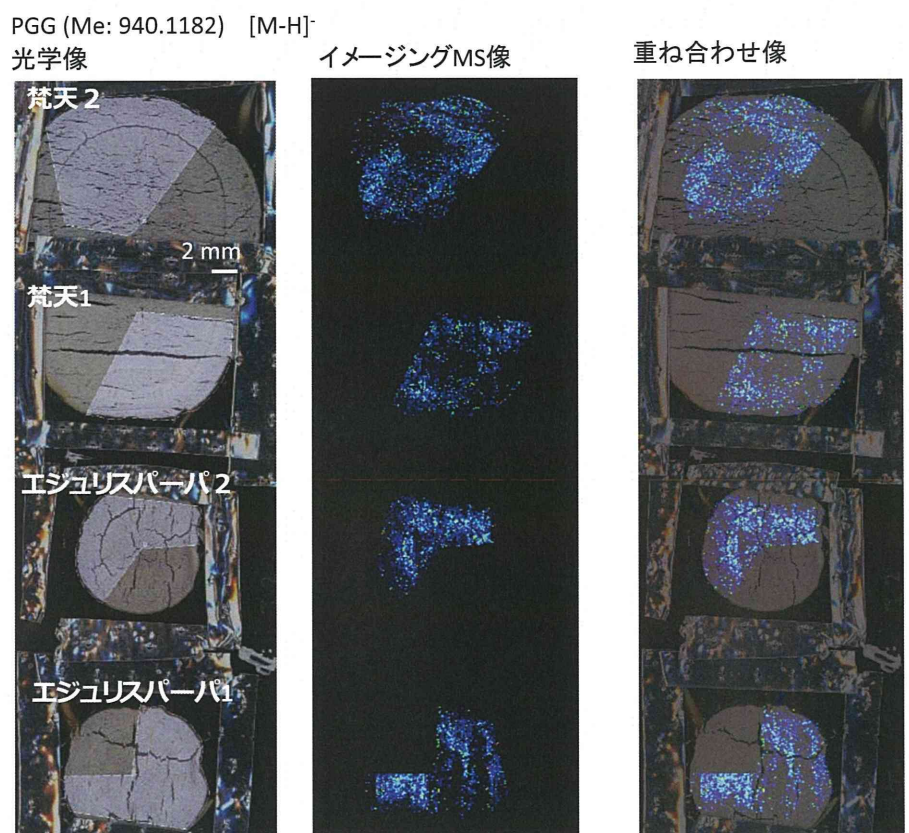


図7d シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像-PGG  
 シャクヤクの品種「梵天」1,2及び「エジュリスパーバ」1,2について、PGGの脱プロトン体  $m/z$   
 939でイメージングした。

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた

実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）

分担研究報告書

分担研究課題：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—ダイオウとシャクヤクの地下部に含有される無機成分に関する研究—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 生薬「大黄」及び栽培したダイオウ、ならびに生薬「芍薬」及び栽培したシャクヤクの根を用いて、無機元素の分布様式や含有量を測定した。まず蛍光X線分析を用いて元素のマッピングを行った結果、生薬「大黄」では、カリウムは、根茎ではコルク層、皮層の最外部及び髓に多く存在し、根では木部の中央部に多く存在した。カルシウムは根茎ではコルク層、皮層の最外部、維管束に多く存在した。栽培シャクヤクの根では、カリウムは皮層と木部の中心部またはほぼ全体に検出され、外皮にも存在した。カルシウムは形成層のすぐ内側の木部に多く検出され、外皮にも存在した。硫黄はわずかに検出される程度であった。芍薬市場品でも同様であったが、カルシウムは白芍より赤芍が多かった。一方で、生薬「大黄」では、栽培品に見られなかった硫黄が検出されたことから、乾燥過程において、何らかの硫黄分を含む燃料が使用され、その結果、硫黄が表面に付着したものと考えられた。生薬「芍薬」でも乾燥または漂白の目的で使用された硫黄が生薬にも残留していることが示唆され、これを検出するために蛍光X線分析は有用な手法であった。

次に ICP 発光分析を行った結果、生薬「芍薬」では、根にはカルシウムが多く、次いでカリウム、マグネシウム、ナトリウムの順であった。根を煎じた場合の水溶液中にもこれら4種類の元素が溶出していたが、特にカリウムが多かった。

#### 研究協力者

伏見裕利 富山大学和漢医薬学総合研究所  
准教授

つづいて指標となる成分が規定されている場合は、各種分析機器を用いて、特定の成分含量の測定を行うことにより、品質が決まっているのが現状である。

#### A. 研究目的

薬用植物を栽培して収穫した場合、最初に品質の良し悪しを判断する点として、形、色、重さ、香りなど人間の五感に頼るものに着目して判断している。収穫物が根などの地下部である場合、その根の長さや太さ、色、つや、虫食いの状況、そして重量などが目安となる。

薬用植物は生長の過程で、一次代謝産物と二次代謝産物が蓄積されており、ダイオウの根茎では Sennoside 類が、またシャクヤクの根では、Paeoniflorin が知られており、それぞれの生薬の品質を左右する物質として知られている。

一方で、栽培方法だけでなく、収穫後の乾

乾燥方法や修治法にも配慮すべきことがある。乾燥時に品質の悪い硫黄分を含有する石炭を使用したり、漂白を目的として硫黄分を用いた燻蒸を行ったりすることもあるので、注意が必要である。これまでに川原らは、生薬中の残留二酸化硫黄について、食品衛生検査指針に記載されている改良ランキン装置を用いるアルカリ滴定法による測定を行っている<sup>1)</sup>。生薬中に残存する硫黄分が、人体へ及ぼす影響も否定できないことから、継続した検討が必要である。

今回、無機元素に着目し、生薬「大黄」及び栽培したダイオウ、ならびに生薬「芍薬」及び栽培したシャクヤクの根を用いて、無機元素の分布様式や含有量を測定した。まず、蛍光X線分析を用いて元素のマッピングを行った。つづいてICP発光分析を用いて、生薬「芍薬」及び栽培したシャクヤクの根に含有される無機成分の種類と含量について、また煎じ液を作成したときに水溶液中に溶出する無機成分の量について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

#### 1) 蛍光X線分析

生薬材料: 中国四川省市場で購入した「大黄」市場品 (TMPW No. 20244)、中国広西壮族自治区市場で購入した「白芍」市場品 (TMPW No. 26974 ; D22) (表 1)。

植物材料「シャクヤク」: 春の粧 S1-3、(表 2)。

#### 2) ICP 発光分析

生薬材料: 中国市場で購入した中国産「芍薬」市場品 3 点 (Sample No. 1、2、3)、日本市場で購入した中国産「芍薬」市場品 3 点 (Sample No. 4、5、6)、日本市場で購入した日本産「芍薬」市場品 2 点 (Sample No. 7、8)、日本市場で購入した中国産「赤芍」市場品 2 点 (Sample No. 9、10) の合計 10 点 (表 3)。

植物材料: 富山県薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤク「梵天」3 点 (Sample No. 11、12、13) 及び「エジュリスパーバ」3 点 (Sample No. 14、15、16) の合計 6 点 (表

4)。

## 2. 実験方法

### 1) 蛍光X線分析

四川省成都市場品の生薬「大黄」について横断面の部分について、エネルギー分散型蛍光X線分析装置 (EDAX EAGLE  $\mu$  Probe) を用いて無機元素のマッピングを行った。測定元素は、Na、Mg、Al、Si、P、S、Cl、K、Ca、Ti、Mn、Fe の 12 元素とした。植物材料「シャクヤク」も同様に行った。

### 2) ICP 発光分析

市場品及び根部の全体量としての測定では、市場品またはシャクヤクの根について、粉末 4 mg に  $\text{HNO}_3$  を 1 ml 加え、室温で 1 日放置した。抽出溶液 200  $\mu\text{l}$  を取り、9.8 ml の水に加えた後、PTFE メンブランフィルター (0.22  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、測定試料とした<sup>2)</sup>。

煎じ液中に溶出する無機元素の測定では、生薬市場品またはシャクヤクの根について、10 g を正確に計り、超純水 500 ml を加え、煎じ器 (ウチダ和漢薬製) を用いて 40 分間加熱抽出した。抽出液を 500ml にメスアップし、PTFE メンブランフィルター (0.22  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、 $\text{HNO}_3$  を加えて測定試料とした。

作成した測定試料は、ICP発光分析装置 (株式会社パーキンエルマージャパン Optima 7300DV) を用い、含有される無機元素の種類と量を測定した。測定元素は、ナトリウム (Na)、マグネシウム (Mg)、アルミニウム (Al)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、チタン (Ti)、マンガン (Mn)、鉄 (Fe)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ストロンチウム (Sr) の 11 元素とした。

## C. 研究結果

蛍光 X 線分析を行った結果、生薬「大黄」(TMPW No. 20244) では、カリウムは皮層にやや多い傾向にあり、その他の部位にはほぼ均一に分布していた。カルシウムは最外部から維管束にやや多い傾向が認められた (図 1)。

シャクヤクの根では、形成層のすぐ内側の木部 (新生木部) ではカルシウムが多く認められたが、カリウムは少ない傾向にあり、カ

リウムは皮層と木部中心部にやや多く認められた(図2)。

ICP発光分析により根部の全体に含有される11種類の無機元素に関して、種類と量について検討した結果、生薬材料10点では、ナトリウム、マグネシウム、カリウム及びカルシウムの4種類の無機元素が確認され、これら以外の7種類の元素は検出されなかった。4種類の元素の中では、カルシウムが最も多く、次いでカリウム、マグネシウム、ナトリウムの順番であった(図3: No. 1-10)。

煎じ液中に溶出する無機元素を測定するために水抽出物を作成し、ICP発光分析により測定したところ、生薬材料と植物材料ともにカリウムが最も多く検出され、次いでカルシウム、マグネシウム、ナトリウムが検出された(図4: No. 1-10)。

中国産赤芍では、中国産芍薬及び日本産芍薬に比べてやや多いカルシウムの溶出が認められるに過ぎなかった(図4: No. 9, 10)。シャクヤクの品種の「エジュリスパーバ」では、材料が5年生の根で直径が同じ0.5~1 cmであり、採花の数のみが異なる株であったため、4元素の溶出量にほとんど差がなかった。一方、「梵天」では8年生の株の根でカリウム濃度が 104.5 ppmと高く、4年生の株で根の直径が1 cm以上のもので85.2 ppm、0.5~1 cmのもので65.2 ppmであった(図4: No. 11-16)。

#### D. 考察

蛍光X線分析を行った結果、生薬「大黄」において、これまで指摘されていなかった硫黄が検出された。ダイオウは乾燥しにくい植物材料であるため、生薬として乾燥させる時には凍結乾燥や、加熱などにより乾燥が行われている。今回比較に用いた生薬材料では、乾燥過程において、何らかの硫黄分を含む燃料が使用され、その結果、硫黄分が表面に付着したものと考えられた。

生薬「芍薬」及び栽培したシャクヤクの根を実験材料として、根の全体量、並びに煎じた場合に水溶液中に溶出する無機元素の種類と量についてICP発光分析で明らかにした。

ICP発光分析の結果から、生薬「芍薬」及びシャクヤクの根には、主としてカルシウムとカリウムが含有されるとともに、煎じ液中にはカルシウムの9.1倍のカリウムが溶出することが確認できた。その他の元素については、植物体における含有量が少なかったため、煎じ液中にもそれらの溶出が検出されなかったものと考えられる。これらの結果は、蛍光X線分析によりカリウム及びカルシウムの組織内分布が確認できた内容と一致した。芍薬中に多く存在していたカルシウムが、煎じ液にした場合、水溶液中にあまり溶出されなかった理由として、カルシウムはその多くがシュウ酸塩として存在しているためであると考えられる。一方カリウムは、特に植物体内で無機化合物や有機化合物を形成せずに、カリウムイオンとして、根の発育や細胞内の浸透圧調整に関与していることが知られている。さらにカルシウムよりカリウムのイオン化傾向が大きいため、煎じ薬を作成した場合に、カリウムが多く検出されたと考えられる。

今回、煎じ液への溶出に関しては、「エジュリスパーバ」でやや少なく、一方8年生の「梵天」で高かった。材料を増やして検討する必要があるが、生育年数の違いや根の直径に係わるシャクヤクの根の組織構造の変化が、無機元素の溶出に関連する可能性が考えられる。

これまで生薬「芍薬」については、原子吸光度法を用いた、ナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウム等13種類の無機成分の定量<sup>3)</sup>や、ICP-MS分析による10種類の無機成分の定量結果が報告されているが<sup>2)</sup>、実際に煎じ液を作成し、水溶液中に溶出する無機元素の種類と含量を定量した報告はない。

生薬の無機成分の組成や含量は、生薬を特徴付ける一指標となり得るが、その結果が直接、煎じ液の無機成分の組成を表すとは限らない。生薬本体と、煎じ液にした場合を常に考えて、両者について分析することが不可欠である。